

#6

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re PATENT APPLICATION of
Inventor(s): Möckel et al.

| | | |
|-------------|----|--------------|
| Appln. No.: | 09 | 935,757 |
| Series Code | ↑ | ↑ Serial No. |

Group Art Unit: to be assigned

Filed: August 24, 2001

Examiner: to be assigned

Title: Sequences which code for the sigE gene

| | | |
|------------|----------|------------|
| Atty. Dkt. | P 282664 | 000445 BT |
| | M# | Client Ref |



Date: December 6, 2001

**SUBMISSION OF PRIORITY
DOCUMENT IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

| <u>Application No.</u> | <u>Country of Origin</u> | <u>Filed</u> |
|------------------------|--------------------------|--------------|
| DE 101 26 422.4 | GERMANY | May 31, 2001 |

Respectfully submitted,

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group

1600 Tysons Boulevard
McLean, VA 22102
Tel: (703) 905-2000

By Atty: Michael A. Sanzo Reg. No. 36912

Sig: *Michael A. Sanzo* Fax: (703) 905-2500
Tel: (703) 905-2173

Atty/Sec: MAS/AMX

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 26 422.4

Anmeldetag: 31. Mai 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Priorität: 02.09.2000 DE 100 43 336.7

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 3. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigE-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene

amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue
5 Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,
sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich
10 ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

20 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
25 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
30 von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors E aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine

5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenzen, gezeigt in SEQ ID No. 1, SEQ ID NO. 3 oder 4, oder

10 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

20 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

25 coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das sigE-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor E kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigE-Gens aufweisen.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren
- 15 Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor E kodieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
- 20 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

- 25 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
- 30 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem

Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors E und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und
10 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt
15 aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die
20 insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigE-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder
25 mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens oder Allels bzw. der Gene oder Allele erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym
30 mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose,

Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung

- 5 *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind
10 besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

- 15 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
20 Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Enzym Sigma-Faktor E kodierende sigE-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

- Zur Isolierung des sigE-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
25 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
30 Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et

al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 5 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326. (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHCT9 (Hohn und 10 Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolívar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 15 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) 20 beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 25 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von 30 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen sigE kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil

der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende
5 Aminosäuresequenz des sigE-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID
10 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner
15 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann
20 unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der
25 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der
30 Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der

eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigE-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in EP 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

15 Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigE-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige

Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)),
5 pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal
10 of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den
15 gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology
20 and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei
25 Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem sigE-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-
30 Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigE-Gens eines
35 oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-A-0699759),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),

- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *sigE*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sigE*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert

werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben

genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 11. April 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und

Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß
Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Corynebacterium glutamicum* DSM5715/pEC-T18mob2sigEexp
als DSM 14229.

- 5 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von
Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie
alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische
Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

- 10 (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring
Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)
durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia*
coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

- Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-
15 Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.
entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

- 20 Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)
beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI
(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell
25 gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer
Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
30 Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem

Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

- 5 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
- 10 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
- 15 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
- 20 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin
- 25 ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des sigE-Gens

- Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,
- 30 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit

shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im
5 Größensbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande,
10 Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den
15 Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde
20 anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

25 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467)
30 mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der
35 Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF

Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

- 5 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte
10 Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

- Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 651 Basenpaaren, welches als sigE-
15 Gen bezeichnet wurde. Das sigE-Gen kodiert für ein Protein von 216 Aminosäuren (SEQ ID NO. 2).

- In gleicher Weise wurden die stromaufwärts (upstream) und stromabwärts (downstream) von SEQ ID NO. 1 gelegenen DNA-Abschnitte identifiziert, die in SEQ ID NO. 3 und SEQ ID
20 NO. 4 dargestellt sind. Die um SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 4 erweiterte sigE-Genregion ist in SEQ ID NO. 5 dargestellt.

Beispiel 3

- Herstellung eines Shuttlevektors pEC-T18mob2sigEexp zur
25 Verstärkung des sigE-Gens in *C. glutamicum*

3.1. Klonierung des sigE-Gens

- Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für
30 *C. glutamicum* bekannten Sequenz des sigE-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 7 und SEQ ID No. 8).

sigE1:

5`TAG TCA CCA CGG TTA AGC CT 3`

sigE2:

5`GCC TTG GTT CTT ACG AAC TG 3`

- 5 Die dargestellten Primer wurden von der Firma ARK Scientific GmbH Biosystems (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Taq-Polymerase der Firma Qiagen
10 (Hilden, Deutschland) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines ca. 2,03 kb grossen DNA-Fragmentes, welches das sigE-Gen trägt.

- Das amplifizierte DNA Fragment von ca. 2,03 kb, welches das
15 sigE-Gen trägt, wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) in den Vektor pCR®2.1TOPO (Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) ligiert. Anschliessend wurde der E. coli Stamm Top10 (Grant et al., Proceedings of the
20 National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) mit dem Ligationsansatz nach Angaben des Kit-Herstellers (Firma Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar
25 (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der
30 Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert und durch Behandlung mit den Restriktionsenzym SphI und EcoRI mit anschliessender Agarosegel-Elektrophorese (0,8 %) überprüft. Die DNA Sequenz des amplifizierten DNA Fragmentes wurde durch Sequenzierung überprüft. Das Plasmid

wurde pCR2.1sigEexp genannt. Der Stamm wurde als E. coli Top10 / pCR2.1sigEexp bezeichnet.

3.2. Herstellung des E. coli - C. glutamicum Shuttle Vektors pEC-T18mob2

- 5 Nach dem Stand der Technik wurde der E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor konstruiert. Der Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGA1 einschliesslich des Replikationseffectors per (US-A- 5,175,108; Nesvera et al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Tetracyclinresistenz vermittelnde tetA(Z)-Gen des Plasmids pAG1 (US-A- 5,158,891; Genbank-Eintrag beim National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) mit der accession number AF121000), die Replikationsregion oriV des Plasmids pMB1 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 43, 77-90 (1979)), das lacZ α Genfragment einschliesslich des lac-Promotors und einer Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, mcs) (Norrandar, J.M. et al. Gene 26, 101-106 (1983)) und die mob-Region des Plasmids RP4 (Simon et al., (1983) Bio/Technology 1:784-791). Der konstruierte Vektor wurde in den E. coli Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert.
- 25 Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 5 mg/l Tetracyclin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und HindIII anschliessender Agarosegel-Elektrophorese (0,8 %) überprüft. Das Plasmid wurde pEC-T18mob2 genannt
- 30 und ist in Figur 1 dargestellt.
- 35

3.3. Klonierung von sigE in den E. coli-C. glutamicum Shuttle Vektor pEC-T18mob2

Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor pEC-T18mob2 verwendet. DNA dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI vollständig gespalten und anschliessend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert.

- 10 Aus dem in Beispiel 3.1. beschriebenen Plasmid pCR2.1sigEexp wurde das sigE-Gen durch vollständige Spaltung mit den Enzymen BamHI und SalI isoliert. Das 1930 bp grosse sigE-Fragment wurde aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

- Das auf diese Weise gewonnene sigE-Fragment wurde mit dem vorbereiteten Vektor pEC-T18mob2 gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 5 mg/l Tetracyclin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI gespalten, um das Plasmid durch anschliessende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wurde pEC-T18mob2sigEexp genannt. Es ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 4

Transformation des Stammes DSM5715 mit dem Plasmid pEC-T18mob2sigEexp

Der Stamm DSM5715 wurde mit dem Plasmid pEC-T18mob2sigEexp
5 unter Anwendung der von Liebl et al., (FEMS Microbiology
Letters, 53:299-303 (1989)) beschriebenen
Elektroporationsmethode transformiert. Die Selektion der
Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5
g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l
10 Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und
18 g/l Bacto-Agar, der mit 5 mg/l Tetracyclin
supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2
Tage bei 33°C.

Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen
15 Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998,
Microbiology, 144, 915 - 927), mit den
Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI geschnitten und
das Plasmid durch anschliessende Agarosegel-Elektrophorese
überprüft. Der erhaltene Stamm wurde
20 DSM5715/pEC-T18mob2sigEexp genannt.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/
pEC-T18mob2sigEexp wurde in einem zur Produktion von Lysin
25 geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im
Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem
entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Tetracyclin
(5 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von
30 dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10
ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die
Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

| | |
|---------------------------------|-----------|
| NaCl | 2,5 g/l |
| Bacto-Pepton | 10 g/l |
| Bacto-Yeast-Extrakt | 10 g/l |
| Glucose (getrennt autoklaviert) | 2 % (w/v) |

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

5 Diesem wurde Tetracyclin (5 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so dass die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,05 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

| | |
|---|------------|
| CSL (Corn Steep Liquor) | 5 g/l |
| MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) | 20 g/l |
| Glucose (getrennt autoklaviert) | 50 g/l |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 25 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 g/l |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 1,0 g/l |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 10 mg/l |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 10 mg/l |
| MnSO ₄ * H ₂ O | 5,0mg/l |
| Biotin (sterilfiltriert) | 0,3 mg/l |
| Thiamin * HCl (sterilfiltriert) | 0,2 mg/l |
| L-Leucin (sterilfiltriert) | 0,1 g/l |
| CaCO ₃ | 25 g/l |

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschliessend wurden die
5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO₃.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Tetracyclin (5 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und
10 80 % Luftfeuchte.

Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Messwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

| Stamm | OD (660 nm) | Lysin-HCl g/l |
|----------------------------|----------------|------------------|
| DSM5715/pEC-T18mob2 | 12,2 | 13.14 |
| DSM5715/pEC-T18mob2sigEexp | 13,07 | 14.09 |

10

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Karte des Plasmides pEC-T18mob2

Figur 2: Karte des Plasmides pEC-T18mob2sigEexp

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

- per: Gen zur Kontrolle der Kopienzahl aus pGA1
- oriV: ColE1-ähnlicher Origin aus pMB1
- rep: Plasmidkodierte Replikationsregion aus C. glutamicum Plasmid pGA1
- 20 RP4mob: RP4-Mobilisierungs-Site
- lacZ-alpha: lacZ-Genfragment aus E.coli

Tet: Resistenzgen für Tetracyclin
sigE: sigE-Gen von C.glutamicum
BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys BamHI
SalI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys SalI
5 sigE: sigE-Gen von C.glutamicum
BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys BamHI
SalI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys SalI

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000445 BT

<140>

10 <141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1330

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (302)..(949)

<223> sigE-Gen

25

<400> 1

accagtggag ccgttgccat tgggtggtggc agccaaagtg gtttagcagct ggccagtcac 60

30

ttcatccggg gcggggagac cgaactcggc ggcgtcttca cgagcgcgcg ctacagcagc 120

gtcggtttca gtagtggact cgacataagt gcgaagatac tcgaaggcgt tactcacgcg 180

ttatagtcta gagcgcagcag gcgagatgtg aagtacctac acgcattaag tgcaaatgaa 240

35

ttcacaattg ccagaagatg cacaggatgt aatctagatt tcccaagttc agtggggcaa 300

a atg act tat atg aaa aag aag tcc cga gat gac gca ccc gtc gta atc 349

Met Thr Tyr Met Lys Lys Lys Ser Arg Asp Asp Ala Pro Val Val Ile

40

1

5

10

15

gaa acc gtt caa gca gaa cat gct gaa gaa ctc acg ggc act gca gca 397

Glu Thr Val Gln Ala Glu His Ala Glu Glu Leu Thr Gly Thr Ala Ala

20

25

30

45

ttc gat gct gga cag gca gac atg cca aca tgg ggc gag cta gtc gca 445

Phe Asp Ala Gly Gln Ala Asp Met Pro Thr Trp Gly Glu Leu Val Ala

35

40

45

50

gaa cat gca gat agc gtt tac cgc ctc gcg tac cgt ctt tcc ggc aac 493

Glu His Ala Asp Ser Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Gly Asn

50

55

60

55

cag cac gat gct gaa gac ctg acc caa gaa aca ttc atg cgt gtc ttc 541

Gln His Asp Ala Glu Asp Leu Thr Gln Glu Thr Phe Met Arg Val Phe

65

70

75

80

cgc tcg ttg aag agc tac cag cca ggc acc ttt gag ggc tgg ctg cac 589

Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Gln Pro Gly Thr Phe Glu Gly Trp Leu His

85

90

95

5 cgc atc acc acc aac ttg ttc ctt gat atg gtt cgc cac cgc ggc aag 637
 Arg Ile Thr Thr Asn Leu Phe Leu Asp Met Val Arg His Arg Gly Lys
 100 105 110

atc cgc atg gag gcg ctg cct gaa gat tat gag cgc gtt ccg ggc aat 685
 Ile Arg Met Glu Ala Leu Pro Glu Asp Tyr Glu Arg Val Pro Gly Asn
 115 120 125

10 gac atc acc cca gag cag gca tac acc gaa gct aac ctt gac cca gct 733
 Asp Ile Thr Pro Glu Gln Ala Tyr Thr Glu Ala Asn Leu Asp Pro Ala
 130 135 140

15 ctg cag gca gcc ctc gat gag ttg agc cca gac ttc cgc gtg gca gtg 781
 Leu Gln Ala Ala Leu Asp Glu Leu Ser Pro Asp Phe Arg Val Ala Val
 145 150 155 160

20 atc ctc tgt gat gtt gtt ggt atg agc tat gac gaa atc gca gag acc 829
 Ile Leu Cys Asp Val Val Gly Met Ser Tyr Asp Glu Ile Ala Glu Thr
 165 170 175

25 ctc gga gtg aaa atg ggt acc gtg cgt tcc cgt att cac cgt gga cgc 877
 Leu Gly Val Lys Met Gly Thr Val Arg Ser Arg Ile His Arg Gly Arg
 180 185 190

agc cag ctt cgt gca agt ttg gaa gct gca gca atg acc agc gag gaa 925
 Ser Gln Leu Arg Ala Ser Leu Glu Ala Ala Ala Met Thr Ser Glu Glu
 195 200 205

30 gtt tct ttg ttg gtt cca acc cac taaagttggt gtgttttctg acacgacaaa 979
 Val Ser Leu Leu Val Pro Thr His
 210 215

35 cgcaaatgtc gtgtcatttt tgcagctcag tgcattatit tggggttcgt ggtgcggaca 1039
 gggaacttat cacaggcgac atccgtttttg agtagtaggt atcttgata agaagttacc 1099
 cacatccttg aaagtcgaga cacaggaggt catcggaaga tatgttcaat tccgacacca 1159

40 ccgcaaatct ccaagctaaa agtcgagatc gtgcaggatc taaagcaaag cgcagcaggc 1219
 caagttttga ttcagtagcg cgggatgttt tggatgttcg aacaaaaaca gcacaagtta 1279

45 aaaacaaggc taaagagttt tcctctgttg atcacctttc agcagacgcc g 1330

<210> 2
 <211> 216
 <212> PRT
 50 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
 Met Thr Tyr Met Lys Lys Lys Ser Arg Asp Asp Ala Pro Val Val Ile
 1 5 10 15

55 Glu Thr Val Gln Ala Glu His Ala Glu Glu Leu Thr Gly Thr Ala Ala
 20 25 30

Phe Asp Ala Gly Gln Ala Asp Met Pro Thr Trp Gly Glu Leu Val Ala
 35 40 45
 5 Glu His Ala Asp Ser Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Gly Asn
 50 55 60
 Gln His Asp Ala Glu Asp Leu Thr Gln Glu Thr Phe Met Arg Val Phe
 65 70 75 80
 10 Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Gln Pro Gly Thr Phe Glu Gly Trp Leu His
 85 90 95
 Arg Ile Thr Thr Asn Leu Phe Leu Asp Met Val Arg His Arg Gly Lys
 100 105 110
 15 Ile Arg Met Glu Ala Leu Pro Glu Asp Tyr Glu Arg Val Pro Gly Asn
 115 120 125
 20 Asp Ile Thr Pro Glu Gln Ala Tyr Thr Glu Ala Asn Leu Asp Pro Ala
 130 135 140
 Leu Gln Ala Ala Leu Asp Glu Leu Ser Pro Asp Phe Arg Val Ala Val
 145 150 155 160
 25 Ile Leu Cys Asp Val Val Gly Met Ser Tyr Asp Glu Ile Ala Glu Thr
 165 170 175
 Leu Gly Val Lys Met Gly Thr Val Arg Ser Arg Ile His Arg Gly Arg
 180 185 190
 30 Ser Gln Leu Arg Ala Ser Leu Glu Ala Ala Ala Met Thr Ser Glu Glu
 195 200 205
 35 Val Ser Leu Leu Val Pro Thr His
 210 215
 40 <210> 3
 <211> 457
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 45 <220>
 <223> upstream-Bereich
 <400> 3
 tagtcaccac ggtaagcct gcaccaagg gcagcgagc aacgtgtgcg ccttcaatgg 60
 aacgaatata ttcacggtgc tcacgtgctg cttgggtgtc acgatccttg cgggtttgat 120
 50 ccgcaatggt gccgtcaagg agcgcacgag cgagcaccag cgcaccgcct cgtcgaagaa 180
 gcggccaggc ggcgtcgaca agcgccctta aatccatggg ggagacttgg ccgaagacaa 240
 gctgatagct gtcgttgga aggcgactca tcacgtcgag cgggcgcgag agcaagaagc 300
 gtacgcggct gggggaatag ccggcctcgc ggaagagtgc tttggcctgg cgctgatgct 360
 ctgattcagg atcaatgcag gtcagtgtgg tggtatcggc cagtcggttc aggatataca 420
 55 gacccaccaa cccggcagcc ggggtaatcg cgatggc 457

<210> 4
 <211> 299

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

5 <223> downstream-Bereich

<400> 4

10 cagccatggt ttagacaat gaactgtccc gtggcgccat gcatcgcgcc aggctgcaca 60
 ttgtgactg cgctgaatgt agggaagaga ttaaccgtca gcgggaaacc gttgattatc 120
 tccgctcaga gtgcaaaaac gaagaagtgt ccgcccgaat ggacctcaaa gcacggcttg 180
 ccagcctcgc cactgagtgc atgcctggcc ctggcgcgaga gaatttagca atgcagcgcc 240
 cagagtcttt tgtggctaaa gttgagtccg tagtgcgcgc agttcgtaag aaccaaggc 299

15 <210> 5

<211> 2086

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>

<221> CDS

<222> (759) .. (1406)

<223> sigE

25 <400> 5

tagtcaccac ggttaagcct gcaccaaggg gcaggcgagc aacgtgtgcg ctttcaatgg 60
 aacgaatata ttcacggcg tcacgtgctg cttgggtgtc acgatccttg cgggtttgat 120
 30 ccgcaatggt gccgtcaagg agcgcatcgg cgagcaccag cgcaccgcct cgtcgaagaa 180
 gcggccaggc ggcgtcgaca agcgccctta aatccatggg ggagacttgg ccgaagacaa 240
 gctgatagct gtcgttggca aggcgactca tcacgtcgag cgggcgcgag agcaagaagc 300
 35 gtacgcggct gggggaatag ccggcctcgc ggaagagtgc tttggcctgg cgctgatgct 360
 ctgattcagg atcaatgcag gtcagtgtgg tgttatcggc cagtccgttc aggatataca 420
 40 gacccaccaa cccggcagcc ggggtaatcg cgatggcacc agtggagccg ttgccattgg 480
 tgggtggcagc caaagtgggt agcagctggc cagtcatttc atccggggcg gggagaccga 540
 actcggcggc gtcttcacga gcgcgcgcta cagcagcgtc ggtttcagta gtggactcga 600
 45 cataagtgcg aagatactcg aaggcggtac tcacgcgtta tagtctagag cgagcaggcg 660
 agatgtgaag tacctacag cattaagtgc aatgaattc acaattgcca gaagatgcac 720
 50 aggatgtaat ctagatttcc caagttcagt ggggcaaa atg act tat atg aaa aag 776
 Met Thr Tyr Met Lys Lys
 1 5
 aag tcc cga gat gac gca ccc gtc gta atc gaa acc gtt caa gca gaa 824
 55 Lys Ser Arg Asp Asp Ala Pro Val Val Ile Glu Thr Val Gln Ala Glu
 10 15 20

| | | |
|----|---|------|
| | cat gct gaa gaa ctc acg ggc act gca gca ttc gat gct gga cag gca | 872 |
| | His Ala Glu Glu Leu Thr Gly Thr Ala Ala Phe Asp Ala Gly Gln Ala | |
| | 25 30 35 | |
| 5 | gac atg cca aca tgg ggc gag cta gtc gca gaa cat gca gat agc gtt | 920 |
| | Asp Met Pro Thr Trp Gly Glu Leu Val Ala Glu His Ala Asp Ser Val | |
| | 40 45 50 | |
| 10 | tac cgc ctc gcg tac cgt ctt tcc ggc aac cag cac gat gct gaa gac | 968 |
| | Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Gly Asn Gln His Asp Ala Glu Asp | |
| | 55 60 65 70 | |
| 15 | ctg acc caa gaa aca ttc atg cgt gtc ttc cgc tcg ttg aag agc tac | 1016 |
| | Leu Thr Gln Glu Thr Phe Met Arg Val Phe Arg Ser Leu Lys Ser Tyr | |
| | 75 80 85 | |
| 20 | cag cca ggc acc ttt gag ggc tgg ctg cac cgc atc acc acc aac ttg | 1064 |
| | Gln Pro Gly Thr Phe Glu Gly Trp Leu His Arg Ile Thr Thr Asn Leu | |
| | 90 95 100 | |
| | ttc ctt gat atg gtt cgc cac cgc ggc aag atc cgc atg gag gcg ctg | 1112 |
| | Phe Leu Asp Met Val Arg His Arg Gly Lys Ile Arg Met Glu Ala Leu | |
| | 105 110 115 | |
| 25 | cct gaa gat tat gag cgc gtt ccg ggc aat gac atc acc cca gag cag | 1160 |
| | Pro Glu Asp Tyr Glu Arg Val Pro Gly Asn Asp Ile Thr Pro Glu Gln | |
| | 120 125 130 | |
| 30 | gca tac acc gaa gct aac ctt gac cca gct ctg cag gca gcc ctc gat | 1208 |
| | Ala Tyr Thr Glu Ala Asn Leu Asp Pro Ala Leu Gln Ala Ala Leu Asp | |
| | 135 140 145 150 | |
| 35 | gag ttg agc cca gac ttc cgc gtg gca gtg atc ctc tgt gat gtt gtt | 1256 |
| | Glu Leu Ser Pro Asp Phe Arg Val Ala Val Ile Leu Cys Asp Val Val | |
| | 155 160 165 | |
| 40 | ggt atg agc tat gac gaa atc gca gag acc ctc gga gtg aaa atg ggt | 1304 |
| | Gly Met Ser Tyr Asp Glu Ile Ala Glu Thr Leu Gly Val Lys Met Gly | |
| | 170 175 180 | |
| | acc gtg cgt tcc cgt att cac cgt gga cgc agc cag ctt cgt gca agt | 1352 |
| | Thr Val Arg Ser Arg Ile His Arg Gly Arg Ser Gln Leu Arg Ala Ser | |
| | 185 190 195 | |
| 45 | ttg gaa gct gca gca atg acc agc gag gaa gtt tct ttg ttg gtt cca | 1400 |
| | Leu Glu Ala Ala Ala Met Thr Ser Glu Glu Val Ser Leu Leu Val Pro | |
| | 200 205 210 | |
| 50 | acc cac taaagttggt gtgttttctg acacgacaaa cgcaaagtgc gtgtcatttt | 1456 |
| | Thr His | |
| | 215 | |
| | tgcagctcag tgcattatatt tgggggttcgt ggtgcggaca gggaacttat cacaggcgac | 1516 |
| 55 | atccgttttg agtagtaggt atcttgata agaagttacc cacatccttg aaagtcgaga | 1576 |
| | cacaggaggt catcggaaga tatgttcaat tccgacacca ccgcgaatct ccaagctaaa | 1636 |
| | agtcgagatc gtgcaggatc taaagcaaag cgcagcaggc caagttttga ttcagtagcg | 1696 |

5 cgggatgttt tggatgttcg aacaaaaaca gcacaagtta aaaacaaggc taaagagttt 1756
 tcctctgttg atcacctttc agcagacgcc gcagccatgt ttgtagacaa tgaactgtcc 1816
 cgtggcgcca tgcacgcgc caggctgcac attgtgcact gcgctgaatg tagggaagag 1876
 attaacgctc agcgggaaac cgttgattat ctccgctcag agtgcaaaaa cgaagaagtg 1936
 10 tccgccccaa tggacctcaa agcacggctt gccagcctcg ccaactgagtg catgcctggc 1996
 cctggcgagc agaatttagc aatgcagcgc ccagagtctt ttgtggctaa agttgagtcc 2056
 gtagtgcgcg cagttcgtaa gaaccaaggc 2086
 15

<210> 6

<211> 216

<212> PRT

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

25 Met Thr Tyr Met Lys Lys Lys Ser Arg Asp Asp Ala Pro Val Val Ile
 1 5 10 15

Glu Thr Val Gln Ala Glu His Ala Glu Glu Leu Thr Gly Thr Ala Ala
 20 25 30

30 Phe Asp Ala Gly Gln Ala Asp Met Pro Thr Trp Gly Glu Leu Val Ala
 35 40 45

Glu His Ala Asp Ser Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Gly Asn
 50 55 60

35 Gln His Asp Ala Glu Asp Leu Thr Gln Glu Thr Phe Met Arg Val Phe
 65 70 75 80

Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Gln Pro Gly Thr Phe Glu Gly Trp Leu His
 85 90 95

40 Arg Ile Thr Thr Asn Leu Phe Leu Asp Met Val Arg His Arg Gly Lys
 100 105 110

45 Ile Arg Met Glu Ala Leu Pro Glu Asp Tyr Glu Arg Val Pro Gly Asn
 115 120 125

Asp Ile Thr Pro Glu Gln Ala Tyr Thr Glu Ala Asn Leu Asp Pro Ala
 130 135 140

50 Leu Gln Ala Ala Leu Asp Glu Leu Ser Pro Asp Phe Arg Val Ala Val
 145 150 155 160

Ile Leu Cys Asp Val Val Gly Met Ser Tyr Asp Glu Ile Ala Glu Thr
 165 170 175

55 Leu Gly Val Lys Met Gly Thr Val Arg Ser Arg Ile His Arg Gly Arg
 180 185 190

Ser Gln Leu Arg Ala Ser Leu Glu Ala Ala Ala Met Thr Ser Glu Glu
195 200 205

5 Val Ser Leu Leu Val Pro Thr His
210 215

10 <210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

15 <220>
<223> Primer sigE1

<400> 7
tagtcaccac ggттаgcct

20

20 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

25 <220>
<223> Primer sigE2

30 <400> 8
gccttggttc ttacgaactg

20

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors E aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder

5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,
und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

10 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.

7. Coryneforme Bakterien, in denen das sigE-Gen verstärkt,
insbesondere überexprimiert wird.

15 8. Shuttlevektor pEC-T18mob2sigEexp, der
8.1. ein 1930 bp großes DNA Fragment welches das sigE
-Gen trägt,

8.2 dessen Restriktionskarte in Figur 2 wiedergegeben
wird, und

20 8.3 der in dem Stamm DSM5715/pEC-T18mob2sigEexp unter
der Nr. DSM 14229 bei der Deutschen Sammlung für
Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt
ist.

25 9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere Lysin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
durchführt:

30 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das sigE-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
überexprimiert;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

- 5 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
verstärkt.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das sigE-Gen kodierende
Nukleotidsequenz trägt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das sigE-Gen
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
überexprimiert.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids
(Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sigE
kodiert.
- 30 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen

fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA*,
- 5 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,
- 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi*,
- 10 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen *pgk*,
- 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *zwf*,
- 15.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen *pyc*,
- 15 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen *mgo*,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,
- 20 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom*,
- 15.11 das für die Theonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)*,
- 25 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen *ilvBN*,

- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD*,
- 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* verstärkt bzw. überexprimiert.
- 5 16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 10 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 15 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*,
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* abschwächt.
17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 20 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt.
- 25 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Sigma-Faktor E kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *sigE*-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, enthaltend die

Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4
als Hybridisierungs sonden einsetzt.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19
dadurch gekennzeichnet,
5 das die Hybridisierung unter einer Stringenz
entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

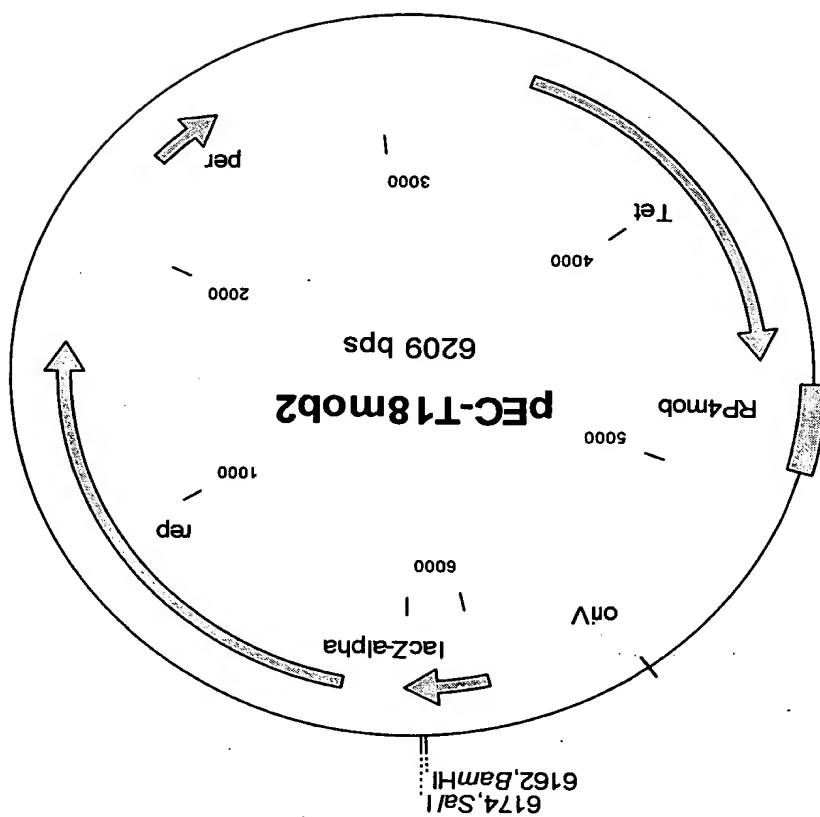
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 10

- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- 15

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigE-Gen verstärkt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

20

Figur 1: Karte des Plasmides pEC-T18mob2



Figur 2: Karte des Plasmides pEC-T18mob2sigExp

